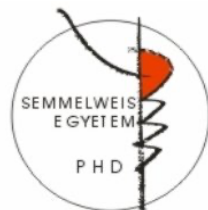


**A MEMÓRIA, A FELEJTÉS  
ÉS A SZINAPTIKUS POLARITÁSOK VIZSGÁLATA  
A CAENORHABDITIS ELEGANS  
IDEGRENDSZERÉBEN**

**PhD téziszfüzet**

**Dr. Fenyves Bánk Gábor**

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola  
Semmelweis Egyetem



Témavezetők: Csermely Péter, az MTA rendes tagja  
Dr. Sőti Csaba, az MTA doktora

Opponensek: Dr. Cserép Csaba, PhD  
Dr. Christos Chinopoulos, PhD

A Komplex Vizsga Bizottság elnöke:  
Dr. Réthelyi János, PhD

A Komplex Vizsga Bizottság tagjai:  
Bak Judit, PhD  
Dr. Hangya Balázs, PhD

Budapest

2020

# 1 Bevezetés

Az idegrendszer működése régóta foglalkoztatja az emberiséget, bővülő ismereteink mellett ugyanakkor a kérdések komplexitása is fokozódott. Az alapvetően fontos kérdéseket számos tudományterület összefogásával – az anatómiától a molekuláris biológián át a rendszerelméletig – az idegtudományok hivatott megválaszolni. A mind közül legérdekesebb, az emberi agy működésének megértése távoli cél, azonban az idegi működés általános jelenségeinek vizsgálata több fajban is lehetséges, lehetőséget adva a különböző fókuszú és felbontású *in vitro*, *in vivo* és *in silico* vizsgálmódszerek válogatott alkalmazására.

Az idegrendszer működése alapvetően az idegsejtek és idegsejt-csoportok összehangolt, dinamikusan változó aktiválódásaként és gátlódásaként írható le. Egy idegsejt aktiválódása vagy gátlódása alapvetően ioncsatornákon keresztüli ion-áramlás és következményes membránpotenciál-változás miatt fellépő intracelluláris molekuláris változások eredménye. Ezen folyamatokat többszintű, összetett mechanizmusok szabályozzák.

Bármilyen funkcionális működés alapja az idegsejteket és idegrendszeri területeket összekötő kapcsolatok struktúrája, ezért a neuronális kapcsolati hálózat (ún. konnektóm) vizsgálata a funkció szempontjából is fontos. A nagy méretű, komplex rendszerek – amilyen az idegrendszer is – leírásában jelentős szerepe van a gráfelméleti és hálózatelméleti szemléletnek. Az agy lényegében egy olyan hálózat, amelyben a neuronok (a hálózat nódusai) szinapszisokon (a hálózat kapcsolatain) keresztül kommunikálnak egymással. Az idegrendszer hálózatelméleti megközelítése, többek között, hozzájárulhat bizonyos neurológiai megbetegedések jobb megértéséhez, azok diagnosztikájához, és prognosztikai célokat is szolgál. Jelenleg,

teljes kapcsolódási hálózat kizárólag a *Caenorhabditis elegans*-ra vonatkozóan ismert.

A közönséges fonálféreg *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), a rekonstruált konnektóm mellett, számos ok miatt vált az idegtudományi kutatások kedvelt modelljévé: rövid életciklussal, transzparens testtel és teljesen megszekvenált genommal rendelkezik. Génjei kb 40%-ának van humán ortológja. A hermafrodita féreg 302 egyedileg azonosított neuronnal rendelkezik, amelyeket kb. 3000 kémiai és 600 elektromos kapcsolat köt össze. Az interneuronális kommunikáció az emlős rendszerekéhez hasonló.

Az egyszerű szervezet ellenére a *C. elegans* meglepően összetett viselkedésformákra képes. Különböző környezeti ingerekre eltérően és adaptívan reagál, az újonnan megtanult (elsősorban mozgási) viselkedést pedig hosszabb ideig is meg tudja őrizni. A különböző memória fázisokat (t.i. rövid- és hosszútávú memória) sokrétű molekuláris folyamatok vezérlik, amelyek genetikai hátterét részben átfedő transzkripciós, translációs és poszt-transzlációs mechanizmusok adják. A tanulás, az emlékezés és a felejtés is egyedi genetikai szabályozókkal (is) bír.

A szinaptikus plaszticitás strukturális szinten a sejtvezeték, pl. az aktin-szerkezet átrendeződésében nyilvánul meg, így a citoskeleton szabályozói potenciálisan a tanulással és memóriával is összefüggnek. Az RNS-kötő doménnal rendelkező Musashi fehérjecsald tagjai (*msi-1* *C. elegans*-ban, *msi1/msi2* humánban) ilyen szabályozók, mivel kapcsolatba hozták őket az aktin-elágazódás szabályozásával.

Alapvető strukturális információk, így a szinaptikus kapcsolatok típusa és iránya elektronmikroszkópia segítségével feltérképezhetők, de lényegi funkcionális ismeretet (pl. neurotranszmitter típus, aktiváló vagy serkentő kapcsolat) általa

nem kapunk. Ugyanakkor a génexpresszió – így a neurotranszmitter és receptor expresszió – neuron-specifikus elemzése lehetőséget adhat a szinaptikus polarítások akár rendszerszintű vizsgálatára.

## 2 Célkitűzés

Doktori tanulmányaim célja a *C. elegans* idegrendszerének és viselkedésének jobb megértése volt kísérletes és hálózattudományi módszerekkel. Munkám során kísérletesen vizsgáltam a *C. elegans* averzív olfaktorikus hosszú távú memóriaműködésének molekuláris folyamatait, genomikai és egyedi gén szinten is. Vizsgáltam a Musashi (MSI-1, *msi-1*) memóriában és felejtésben betöltött neuron-specifikus szerepét, és a kapcsolódó szubcelluláris szinaptikus folyamatokat. Továbbá, célul tűztem ki a hosszú távú memória farmakológiai modulációját.

Mint minden viselkedésforma, a tanulás és az emlékezés is komplex, de meghatározott szinaptikus infrastruktúrában létrejövő neurobiológiai aktivitás eredménye. Célul tűztem ki a *C. elegans* konnektóm rendszerszintű elemzését, strukturális és génexpressziós adatok felhasználásával a funkcionális, elsősorban a kémiai szinapszisok polarítására vonatkozó specifikus ismeretek bővítését.

A doktori értekezés célja a *C. elegans* idegrendszerének jobb megismerésén keresztül a komplexebb rendszerek – végső soron az emberi agy – megértéséhez való hozzájárulás volt.

### 3 Módszerek

Az értekezéshez hasonlóan, ebben a fejezetben – a Doktori Iskola iránymutatásának megfelelően – a korábbi publikációkban már közölt módszerek nem kerülnek tételes bemutatásra.

A farmakológiai kísérletekhez az alábbi törzseket használtuk szereztük be a *C. elegans* Genetic Center-ből (Minneapolis, USA): vad típusú Bristol törzs N2 variáns; *crh-1(tz2)*; *msi-1(os1)*. Egy új kondicionálási protokollt fejlesztettünk ki, amely lehetővé tette a farmakológiai kezelést az averzív kondicionálás során is. A hagyományos CTX-lemezen történő kondicionálás helyett a férgeket 15 ml 5% w/v-os mannóz oldatban kondicionáltuk 0,02% diacetyl jelenlétében. Az oldatok 1% dimetil-szulfoxidot tartalmaztak a megfelelő oldhatóság érdekében. A tesztelt hatóanyagok változó koncentrációban (10-500  $\mu\text{M}$ ) kerültek alkalmazásra. Az L4 stádiumú, OP50 baktériummal jól táplált férgeket 15 ml-es Falcon csövekben kétszer átmostuk CTX oldattal. A férgeket folyadékban a kondicionálást megelőzően (1 óra), annak során (2x1 óra), illetve azt követően (0,5 óra) kezeltük.

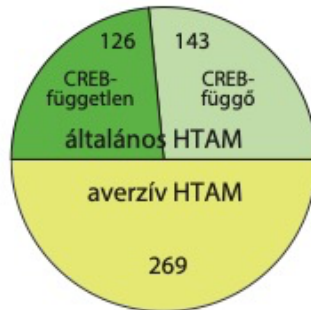
A szinaptikus előjelek predikciójához a WormWiring hermafrodita konnektóm kémiai szinapszis alhálózatát (3.638 kapcsolat/20.589 szinapszis és 297 neuron) használtuk. A neurons-specifikus neurotranszmitter- és receptor génexpressziós adatbázist korábbi publikációk és a Wormbase (<http://wormbase.org>) manuális kurációjával hoztuk létre. Kiértékelést a három domináns kémiai neurotranszmitterre (glutamát, acetilkolin, GABA) specifikus ionotróp receptor alegységekre vonatkozóan végeztünk, bináris jelleggel (expresszált – nem expresszált).

A szinaptikus polarítások predikcióját a preszinaptikus neuronok neurotranszmitter expressziója és a posztszinaptikus neuronok receptor gén expressziója alapján végeztük, összetett logikai függvények alkalmazásával. A szinapszisokat *serkentőnek* (vagy *gátlónak*) prediktáltuk, amennyiben kizárólag kation (vagy anion) csatorna receptor gének voltak társíthatók a preszinaptikus neurotranszmitterhez; *komplexnek* prediktáltuk, ha mindkét típusú receptor gén expresszálódott; és *ismeretlennek*, amennyiben semmilyen receptor gén nem volt társítható a neurotranszmitterrel. Az algoritmusok elérhetők az alábbi honlapon: <http://EleganSign.linkgroup.hu>.

## 4 Eredmények

### 4.1 Hosszú távú memória során megfigyelhető génextpressziós minták

A memória kialakulásához és hosszú távú konszolidációjához transzkripció és transláció is szükséges. Az érintett gének azonosítása érdekében microarray vizsgálatot végeztünk neuronálisan halmozott RNS-en, a memória-indukciót megelőző és követő több időpontban. Azonosítottunk 538 felülszabályozott és 174 leszabályozott gént. Az aktivált gének 50%-t paradigma-független, általános hosszú távú memória génként azonosítottuk, amelyek többsége CREB-függő génként ismert (1. ábra).



**1. ábra. A felülszabályozott gének megoszlása.** Az 538 averzív kondicionálást követően felülszabályozott gén 50%-a pozitív kondicionálást követően is felülszabályozott, egy korábbi publikáció alapján. Ezen gének közül 126 CREB-független, míg 143 CREB-függő módon szabályozott.

## 4.2 CREB-modulátorok hatása a hosszú távú memóriára

Míg a CREB-aktivitás befolyása a kognitív funkcióra és a memóriára ismert, egyelőre nincs törzskönyvezett hatóanyag, amely a memóriát a CREB-moduláción keresztül javítaná. Kísérleteinkben két, CREB-et célzó farmakofór memóriára gyakorolt hatását vizsgáltuk *C. elegans*ban egy újonnan kifejlesztett vizsgálati módszerrel. A Naphthol AS-E alkalmazásakor meghosszabbodott averzív memóriát figyeltünk meg, míg a 666-15i jelű anyag alkalmazásakor hatást nem észleltünk.

## 4.3 A MSI-1 szabályozza a hosszú távú memóriát / felejtést a citoskeleton-átrendeződés transzlációs szabályozása által

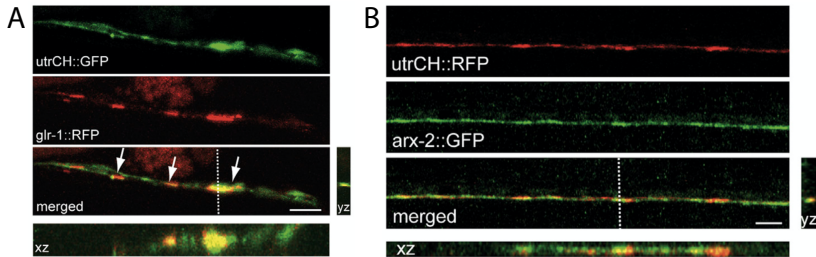
A citoskeleton-, azon belül is az aktin-átrendeződés szinaptikus plaszticitásban való részvétele régóta ismert. Nemrég felismerték, hogy a Musashi, egy neuronálisan expresszált RNS-kötő fehérje interakcióba lép az Arp2/3 aktin elágazódást szabályozó fehérje-komplex alegységeinek mRNS-ével, potenciális memória-szabályozóként megjelölve azt.

Munkánk során a Musashi (*C. elegans*ban *msi-1*) averzív olfaktorikus tanulásban és memóriában betöltött szerepét vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a *msi-1(lf)* funkcióvesztő mutáns törzs intakt tanulási, de megnyúlt memória fenotípussal rendelkezik. A fenotípus aspecifikus és AVA interneuronra specifikus MSI-1 re-expresszióval egyaránt menekíthető. Vagyis, a *msi-1* valószínűsíthetően az AVA interneuronban expresszálódva fejt ki memóriát rövidítő hatását. Kimutattuk, hogy a MSI-1 alulszabályozza a citoskeletális aktin-



elágazódást reguláló Arp2/3 fehérjekomplex három alegységének translációját (*arx-1*, *arx-2*, *arx-3*). Továbbá, az AVA interneuronban megfigyeltük az ARX-2 szubcelluláris kolokalizációját F-aktin és GLR-1 glutamát receptor fehérjékkel (2. ábra).

Mindezek arra utalnak, hogy a MSI-1 a memórianyomok törlését (felejtését) a glutamáterg szinapszisok strukturális átrendeződésén keresztül szabályozza.



**2. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek az AVA interneuronról.** **A** Az F-aktin eloszlását az elülső dúcláncban GFP-fuzionált utrophin CH-val detektáltuk (felső panel, zöld), míg a GLR-1-t RFP-vel fuzionáltuk (középső panel, piros). A kolokalizációt sárga szín jelzi. **B** Az F-actin (felső panel, piros) és az ARX-2 (középső panel, zöld) eloszlása az elülső dúclánc vonalában az AVA interneuronban. A kolokalizációt sárga szín jelzi. Az yz-irányú metszet síkját a pontozott vonal jelzi. A skála 1mm-es.

## 4.4 Polaritás predikció a *C. elegans* ionotróp kémiai szinapszisok hálózatában

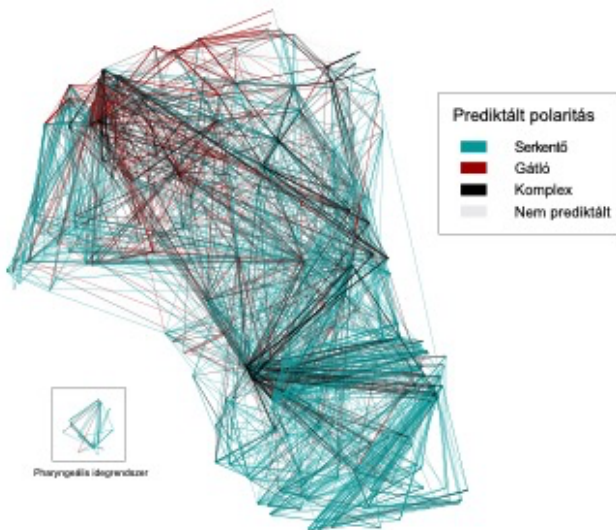
A jelenleg elérhető strukturális konnektómok hiányossága, hogy nem rendelkeznek pontos információval a polaritásokról, vagyis hogy mely szinapszis serkentő és melyik gátló. Az ionotróp kémiai neurotranszmisszió során a preszinaptikusan

felszabaduló neurotranszmitterek a posztszinaptikus membránon elhelyezkedő ligand-függő ioncsatorna receptorokat aktiválják, ami ionok be- és kiáramlásán keresztül a posztszinaptikus neuron aktiválódásához vagy gátlódásához vezet. Habár korábbi modellekben a preszinaptikusan felszabaduló neurotranszmitter típusa alapján határozták meg a kapcsolat serkentő vagy gátló mivoltát (pl. a glutamáterg kapcsolat serkentő), mi egy olyan modellt javasoltunk, amelyben a posztszinaptikus receptor expresszió egyaránt fontos tényezőként szerepel.

Az ionotróp kémiai kapcsolatok polaritásának predikciója során elsőként egy neuron-specifikus génexpressziós térképet állítottunk össze a Wormbase adatbázis és korábbi publikációk alapján. Az ionotróp receptor géneket hat csoportba osztottuk az neurotranszmitter partner (glutamát, acetilkolin és GABA), illetve az ioncsatorna feltételezett típusa (kation- vagy anioncsatorna, vagyis serkentő vagy gátló) alapján. Ezt követően létrehoztunk egy algoritmust, amely szinaptikus polaritást prediktál preszinaptikus neurotranszmitter és posztszinaptikus receptor gén expresszió alapján. A szinapszisokat *serkentőnek* (*gátlónak*) prediktáltuk, amennyiben megfelelő neurotranszmitter expresszió mellett kizárólag kation (anion) csatorna receptor gének expresszálódtak posztszinaptikusan; valamint *komplexnek*, amennyiben mindkét típusú receptorra volt expressziós adat. Eszközünkkel a 20.589 kémiai szinapszis 73%-ban sikerült előjelet prediktálnunk, amely szerint 9.034 szinapszis serkentő, 2.580 gátló és 3.431 komplex (3. ábra).

A fenti predikciós módszerrel a serkentő és gátló szinapszisok aránya (excitációs:inhibíciós [E:I] arány) 4:1. Ez az arány beleillik az egyéb, stabil hálózatokban megfigyelt E:I arányokba, ugyanakor jelentősen különbözik a kizárólag neurotranszmitter expresszió alapuló predikcióval kapott aránytól.

Kiemelendő, hogy bizonyos szinapszis alcsoportokban az E:I arány jelentős különbözőségeket mutatott: például a motoneuronokat a szenzoros neuronokkal összekötő szinapszisok esetén az E:I arány 1:10, míg az interneuronok és motoneuronok közötti kapcsolatoknál 14:1 volt. Megfigyeltük, hogy a kommunikációs szempontból előremutató (szenzor–inter–motor) irányban excitációs túlsúly van, míg a hátramutató (motor–inter–szenzor) irányban gátló túlsúly.



**3. ábra.** A *C. elegans* kémiai szinapszisa által alkotott hálózat. A hálózatos ábrázolás a Cytoscape EntOpt plugin-jével történt. Az élek a serkentő (kék), gátló (piros) és komplex (fekete) kapcsolatokat ábrázolják, a csomópontok a neuronokat.

A polaritás predikciós eszköz az alábbi honlapon publikusan elérhető: <http://EleganSign.linkgroup.hu>. Az alkalmazott kódok az alábbi GitHub oldalon érhetők el: <https://github.com/bank-fenyves/CeConn-SignPrediction>.

## 5 Következtetés

E doktori értekezésben összefoglalt munkánk során a *C. elegans* idegrendszerét vizsgáltuk kísérletes, hálózattudományi és *in silico* módszerekkel.

1. Feltérképeztünk számos, a tanulással, memóriával és felejtéssel összefüggő molekuláris mechanizmust. Azonosítottunk 143 CREB-függő, de a tanulási paradigmától független, a hosszú távú memória során felülexpresszált gént. Felvetettük, hogy a hosszú távú memória CREB-en keresztüli farmakológiai modulációja lehetséges, amely eredményünket további kísérletekben szükséges validálni.
2. Megállapítottuk, hogy az RNS-kötő Musashi fehérje (*msi-1*) a memória aktív negatív szabályozója, amely funkció elsősorban az AVA interneuronban, az aktin citoskeleton átrendeződés modulálásán keresztül valósul meg. Mivel a Musashi humán ortológgal is rendelkezik, e mechanizmus potenciális klinikai relevanciával is bír.
3. Összeállítottunk egy egyedi neurotranszmitter és receptor gén expressziós adatbázist és kifejlesztettünk egy algoritmust, amely ezen adatok alapján prediktálja a kémiai szinapszisok polaritását a teljes hálózatban. A szinapszisok 73%-ára vonatkozóan végeztünk predikciót és megmutattuk, hogy a stabil valós hálózatokban megfigyelt serkentő-gátló arányhoz hasonló egyensúly prediktálható a *C. elegans* ionotróp kémiai hálózatban is (E:I = 4:1). Eredményeink alapján a szinaptikus polaritások predikciójához a preszinaptikus és posztzinaptikus tulajdonságok együttes figyelembevétele szükséges. A konnektómban a szenzor » motor irányban serkentő, míg az ellentétes irányban

gátló túlsúlyt figyeltünk meg, amely a funkcionálisan irányított jelfeldolgozó rendszerek sajátja.

## 6 Közlemények

### 6.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Freytag V, Probst S, Hadziselimovic N, Boglari C, Hauser Y, Peter F, Fenyves BG, Milnik, A., Demougin, P., Vukojevic, V., de Quervain, D. J.-F., Papassotiropoulos, A., Stetak, A. Genome-wide temporal expression profiling in *Caenorhabditis elegans* identifies a core gene set related to long-term memory. *J Neurosci.* 2017;37: 6661–6672. doi:10.1523/JNEUROSCI.3298-16.2017

Hadziselimovic N, Vukojevic V, Peter F, Milnik A, Fastenrath M, Fenyves BG, Hieber, P., Demougin, P., Vogler, C., de Quervain, D. J.-F., Papassotiropoulos, A., Stetak, A. Forgetting is regulated via Musashi-mediated translational control of the Arp2/3 complex. *Cell.* 2014;156: 1153–1166. doi:10.1016/j.cell.2014.01.054

Fenyves BG, Szilágyi GS, Vassy Z, Söti C, Csermely P. Synaptic polarity and sign-balance prediction using gene expression data in the *Caenorhabditis elegans* chemical synapse neuronal connectome network. *PLoS Comput. Biol.* 2020;16: e1007974. doi:10.1371/journal.pcbi.1007974

### 6.2 Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Fenyves BG, Arnold A, Gharat VG, Haab C, Tishinov K, Peter F, de Quervain D, Papassotiropoulos A, Stetak A. Dual role of an *mpps-2/KCNE*-dependent pathway in long-term memory and

age-dependent cognitive decline. *Curr. Biol.* 2020;31: 1-13.  
doi:10.1016/j.cub.2020.10.069